TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO 6. 2

MÉTODOS INSTRUMENTALES. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO POR ESPECTROSCOPÍA

INTRODUCCIÓN

Dentro de los métodos instrumentales de importancia en el análisis químico se encuentran los métodos espectroscópicos, basados en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. En este trabajo abordaremos un tipo particular que es la espectroscopía de absorción molecular, consiste en hacer reaccionar al analito presente en una muestra incógnita con un reactivo determinado para generar una molécula cuya absorción a cierta longitud de onda puede medirse en un espectrofotómetro (molécula absorbente) y posteriormente relacionar la absorbancia medida con la concentración del analito en la muestra analizada. Esta relación puede saberse si el sistema estudiado cumple con la ley de Lambert-Beer:

$$A= \varepsilon . B.c$$

en donde: A es absorbancia, Ɛ es la absortividad molar y C es la concentración molar.

En la práctica de laboratorio, analizar un sistema en solución por este método implica: 1-Averiguar la relación entre A y c, para esto se construye una curva patrón o de referencia; 2- Seleccionar la longitud de onda de trabajo adecuada, para esto se realiza un espectro de absorción; 3- Medir la absorbancia de cada solución patrón y 4- Medir la absorbancia de la muestra incógnita

1- Construir una curva patrón o estándar con soluciones de concentraciones conocidas y crecientes de una sustancia estándar que tenga el analito a estudiar y se agrega reactivo de colorimetría en igual cantidad en todos los tubos (figura 1). El primer tubo de la curva patrón no tiene la sustancia a analizar, se denomina *blanco* y es importante para verificar que no hay desarrollo de color apreciable, esto da idea de que no hay contaminación (analito que es aportado por una fuente externa) ni interferencias (sustancia que da la misma reacción que el analito) que causarían error en la determinación.

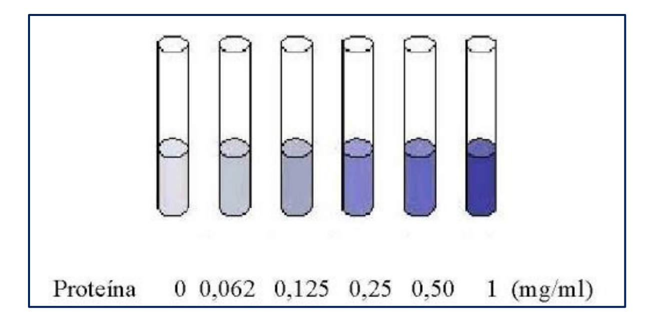


Figura 1: Curva patrón para medir proteína por espectroscopía de absorción molecular, construida a partir de soluciones de proteína estándar de concentración creciente y la misma cantidad de reactivo de colorimetría en todos los tubos. En cada tubo se conoce perfectamente la concentración de proteína. Se observa macroscópicamente que el color desarrollado por la sustancia absorbente aumenta en intensidad desde el primer tubo al último.

Al mismo tiempo, se construye un "tubo muestra" colocando una alícuota determinada de la solución muestra o incógnita y la misma cantidad de reactivo que los tubos de la curva patrón. Todos los tubos de la curva patrón y muestra deben tener el mismo volumen final, para esto se completa con la cantidad necesaria de agua destilada.

2- Determinar experimentalmente la longitud de onda de trabajo. Para esto se construye un espectro de absorción el cual consiste en medir, en el espectrofotómetro, la absorbancia de uno de los estándar de la curva patrón a las longitudes de onda en un rango amplio en donde se conoce que la sustancia absorbente tiene picos de absorción. Se selecciona la longitud de onda a la que se muestra un pico de absorbancia.

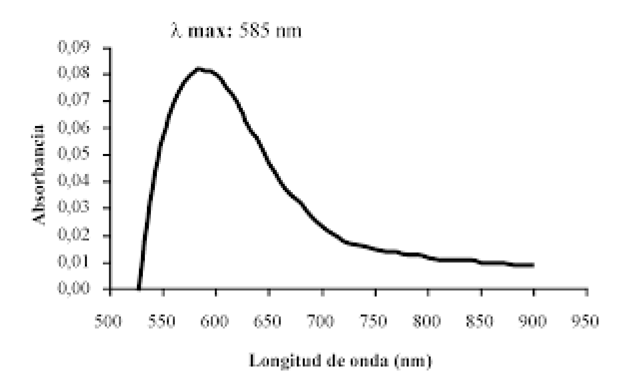


Figura 2: ejemplo de espectro de absorción para una sustancia determinada. En este caso se han medido las absorbancias de una determinada solución estándar cuyo analito quiere estudiarse, entre el rango de longitudes de onda 500 a 900 nm. El máximo de absorción se obtuvo a 585 nm.

3- Medir en el espectrofotómetro la absorbancia de cada mezcla estándar-reactivo de la curva patrón a la longitud de onda determinada en el paso 2. Relacionando las absorbancias medidas con los correspondientes concentraciones de estándar se podrá comprobar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, siempre que los pares A-c de la curva de calibración se puedan alinear en una recta. La pendiente de esta recta será el valor numérico que relaciona absorbancia y concentración del analito.

4- Medir en el espectrofotómetro la absorbancia de la mezcla muestra-reactivo a la longitud de onda seleccionada en 2. Con la absorbancia medida y la pendiente calculada en el paso 3, se obtendrá la concentración de analito proveniente de la muestra.

Los pasos 1 a 4 se realizan en cualquier determinación espectrofotométrica, pero las especificaciones dependerán de cada analito y técnica en particular ya sea se estudie nitrato en agua, fósforo en suelo, proteína en un vegetal, etc.

En el siguiente enlace podrás ver cómo se utiliza el espectrofotómetro para medir absorbancia en cada solución patrón y en la muestra. Observa que en este ejemplo no realizan espectro de absorción, posiblemente porque esta determinación sea de rutina y ya hayan establecido previamente la longitud de onda para este sistema de trabajo. **https://www.youtube.com/watch?v=d1L9QKr8t-M**

APLICACIONES EN AGRONOMÍA

I-Determinación de fósforo en agua

Un caso de espectroscopía de absorción molecular es la determinación de fósforo en agua por el método del ácido fosfomolibdofosfórico. Consiste en hacer reaccionar el fósforo inorgánico presente en el agua con reactivo vanadomolíbdico para dar un complejo color amarillo cuya absorbancia puede medirse a longitud de onda 420 nm. Una aplicación agronómica importante es la determinación de fósforo disponible en suelo agrícola mediante el método de Bray Kurtz. En

este método se extrae previamente el fósforo del suelo con solución extractiva fluoruro de amonio. Luego a cada extracto previamente filtrado se agrega reactivo de Murphy-Riley que forma un complejo molecular llamado azul de molibdeno cuya absorbancia puede medirse a 820 nm.

Importancia de la determinación de fosfato en agua potable:

El ion fosfato (PO_4^{-3}) se forma a partir del fósforo inorgánico que existe como mineral y contribuye directamente en el ciclo de este elemento en el ambiente. También puede existir en solución como partículas, como fragmentos sueltos o en los cuerpos de organismos acuáticos. El agua de lluvia puede contener distintas cantidades de fosfatos que se filtran de los suelos agrícolas a los cursos de agua próximos. El ión fosfato suele operar como un nutriente del crecimiento de algas, una concentración desmedida de fosfatos ocasiona una proliferación no deseada de algas que afectan la cantidad de oxígeno presente en el agua y trae aparejado un proceso de eutrofización. Se admite un valor máximo permisivo de fosfato hasta 25 mg/L para garantizar la calidad del agua que mantenga el equilibrio ambiental.

En el siguiente enlace un grupo de estudiantes universitarias te muestran cómo hacen la determinación de fósforo en agua. Observa con atención la realización de la curva patrón, cómo realizan las medidas espectrofotométricas y el tratamiento de los datos experimentales para hallar la concentración de fósforo en la muestra. https://www.youtube.com/watch?v=Ch2eCZTB3SI&t=325s-

II-Determinación de fósforo extractable en suelo-

Otra aplicación agronómica es medir fósforo extractable en suelo. Este elemento químico se encuentra en el suelo tanto en forma orgánica como en forma inorgánica, en proporciones relativas que dependen del tipo de suelo y del ambiente. Existe un equilibrio entre el fósforo en la fase sólida del suelo y el fósforo en la solución del suelo, este último es la fracción que pueden absorber los vegetales a través de sus raíces. Este equilibrio puede verse modificado por el pH del suelo, siendo el rango de pH 6,0 a 7,0 el de máxima disponibilidad de fósforo.

La determinación de fósforo extractable por espectroscopía de absorción molecular se realiza por el método de Bray Kurtz, denominado así porque la muestra de suelo tamizado 0,5 mm se trata con solución de fluoruro de amonio en medio ácido para extraer el fósforo, esto es solubilizar los fosfatos que pudieran estar insolubles, principalmente los de calcio y algunos de hierro y aluminio.

Otra modificación es la colorimetría de Murphy Riley que utiliza reactivo molibdato de amonio en tartrato ácido de potasio para dar un complejo amarillo y luego agrega ácido ascórbico para dar un compuesto denominado azul de molibdeno, de color azul, de mayor estabilidad que el anterior, cuya absorbancia se mide a longitud de onda adecuada.

Técnica

Es imprescindible que el material de laboratorio de vidrio utilizado en esta técnica esté previamente lavado con detergente no iónico, y luego enjuagado con agua potable y por último agua destilada. Los detergentes de uso habitual tienen fósforo en su composición, por lo que podría producir contaminación y en consecuencia producir resultados erróneos en el análisis.

- **Reactivos**

- **Solución extractiva (solución de Bray y Kurtz)**: NH_4F 0,03 M en HCl 0,025 M.
- **Solución estándar de fósforo madre**: Se prepara una solución madre que contenga 100 ppm de P, para ello se utiliza KH_2PO_4, el cual se seca en estufa durante 4 horas a 100 ^{0}C. Se deja enfriar en desecador y se pesa exactamente la cantidad necesaria, se disuelve en agua destilada y se estabiliza con 25 ml de ácido sulfúrico 7 N por litro de solución patrón.
- **Solución estándar 3 ppm P.** Se prepara a partir de la solución madre. Esta solución es inestable, conviene prepararla cada vez que se necesite
- **Reactivo para colorimetría (reactivo de Murphy y Riley)**: una vez preparado dura entre 2 y 4 horas. Se mezclan:

  50 mL de H_2SO_4 5 N

  5 mL de solución de tartrato de antimonio y potasio 0.3% ($K_2Sb_2\ C_8H_4O_{12}\ .3H_2O$)

  15 mL de solución de hepmolibdato de amonio 4% $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$

  30 mL de ácido ascórbico 1.8 % ($C_6H_8O_6$)

Por razones de estabilidad es conveniente preparar la mezcla reactiva sin el ácido ascórbico y agregar éste en forma separada.

-Extracción del fosfato del suelo

- Pesar 1,00 g de suelo (previamente acondicionado y tamizado por 0.5 mm) en un tubo de ensayo

- Agregar 7,00 mL de solución de Bray y Kurtz y agitar fuertemente durante 2 minutos, repetir la agitación de vez en cuando hasta media hora.
- Filtrar a través de papel Whatman 42 y recoger el filtrado.

-Preparación de curva patrón y muestras

- Rotular sendos tubos de ensayo según lo indicado el protocolo experimental (B,1,2…) y los tubos para las muestras. Colocarlos en orden en una gradilla.
- Seguir las indicaciones del protocolo y paralelamente hacer los tubos con las muestras según las indicaciones que están más adelante.

Protocolo para la curva de calibración:

tubo →	**B**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**suelo**
mL sol.3ppm P	0,0	0,2	0,4	0,6	1,0	1,4	2,0	3,0	
Extractivo del suelo (mL)	--	--	--	--	--	--	--	--	1,0
Mezcla Reactiva (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H_2O (mL)	5,2	5,0	4,8	4,6	4,2	4,0	3,6	3,2	4,2
Ac.ascórbico (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
µgP									



A partir del dato de concentración de la solución estándar de fósforo y el volumen de ésta en cada tubo de colorimetría, calcula µg de P en los tubos B al 7 y completa la última fila del protocolo.

En el laboratorio, registrar las absorbancias de los tubos B al F leídas en el espectrofotómetro, corregir con la Absorbancia del blanco y obtener en excell los gráficos Abs corregida vs µg P o bien calcular en forma analítica la pendiente de la recta. Con la ecuación de la recta en cada caso, calcular el contenido de fósforo del suelo y expresarlo en ppm.

Escala calificatoria orientativa en suelos

FÓSFORO EXTRACTABLE (Bray-Kurtz) ppm	
< 5	Muy deficiente
5,0 – 7,5	Deficiente
7,5 - 12	Moderadamente deficiente
12 – 20	Moderadamente provisto
20 – 30	Bien provisto
>30	Muy bien provisto

ACTIVIDADES

ACTIVIDAD 1- Accede al siguiente enlace y resuelve en forma individual las consignas del formulario **https://forms.gle/qiWk6kai9Yiw61Hk6**

ACTIVIDAD 2- Elabora, con tus compañeros de grupo, el informe de laboratorio para las muestras de suelo S1, S2 o S3, según te indique el docente. A continuación, tendrás los datos experimentales de masa de muestras pesadas y absorbancias registradas a 820 nm de la curva de calibración y las muestras.

Datos experimentales del método de Bray Kurtz para tener en cuenta en el informe de laboratorio

	S1	**S2**	**S3**
observaciones	**Compost proveniente de un establecimiento de producción porcina de la zona centro bonaerense.**	**Suelo argiudol típico serie Correa (suelo profundo, oscuro, bien drenado, ubicado en áreas onduladas) con agricultura continua durante 16 años**	**Suelo argiudol ácuico serie Amstrong (suelo oscuro, profundo, moderadamente drenado, ubicado en áreas llanas) con agricultura continua de 22 años**
Masa de muestra (g)	**1,050**	**1,023**	**1,065**

Medidas de absorbancia realizadas a 820 nm de los tubos de la curva de calibración y las muestras.

tubo →	B	1	2	3	4	5	6	7	S1	S2	S3
Abs 820 nm	0,005	0,060	0,105	0,172	0,285	0,357	0,531	0,790	0,756	0,085	0,250

Incluye en el informe el gráfico de absorbancias corregidas versus microgramos de P y la ecuación de la recta. A partir de esto, calcula la cantidad de fósforo disponible en la muestra en ppm de P y discute el resultado.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Baldez, C. (2015) *Determinación de fósforo en agua por el método del ácido vanadomolíbdofosfórico mediante espectrofotometría UV-Vis.* (Video) De https://www.youtube.com/watch?v=Ch2eCZTB3SI&t=325s-

- Harris, D.C. (2001) Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Reverté, 2da Edición

- Skoog D.A; West, D.M.; Holler, J.F y Crouch, S.R. (2005) Fundamentos de Química Analítica, Editorial Thomson, 8ª Edición

-Universitat Politécnica de Valencia. (2011) *Determinación de nitritos en agua: Medida de la absorbancia* (video) De https://www.youtube.com/watch?v=d1L9QKr8t-M

Autor: María Alejandra Goyeneche